

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報 (A) 昭61-132189

⑬ Int. Cl.
C 12 N 15/00
C 07 H 21/02
// C 12 P 21/02

識別記号 厅内整理番号
7115-4B
6742-4C
7235-4B

⑭ 公開 昭和61年(1986)6月19日
審査請求 有 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNAおよびその調製法

⑯ 特願 昭59-254217
⑰ 出願 昭59(1984)12月3日

⑱ 発明者 深澤 親房 茨城県新治郡桜村吾妻2丁目802-203
⑲ 出願人 農林水産省食品総合研究所長
⑳ 代理人 弁理士 久保田 藤郎

明細書

1. 発明の名称

ダイズ貯蔵タンパク質のメッセンジャーRNA
およびその調製法

2. 特許請求の範囲

(1) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA。

(2) ダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNAをダイズ種子より抽出し分画することを特徴とするメッセンジャーRNAの調製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法により18Sよりやや重い画分に得られるメッセンジャーRNA（以下mRNAと略す。）およびその調製法に関する。

ダイズ種子に蓄えられる物質の主なものとしてタンパク質、脂質およびフィチン酸塩などが知られているが、これらの貯蔵物質が種子の登熟過程でどのように合成され、蓄積されるのかを知ることは種子生理学的見地からはもとより食品化学の面からも重要である。

本発明者はダイズ貯蔵タンパク質の生理学的役割、生産方法等について研究を重ねてきたが、その過程においてダイズ種子からダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出することに成功し、このmRNAからこれに対応する相補的DNA（以下cDNAと略す。）を調製することに成功した。このようにして得たDNAを微生物細胞内あるいは植物細胞内で発現させることにより目的とするダイズ貯蔵タンパク質を製造することができる。

本発明はダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ダイズ種子より得られ、ショ糖密度勾配遠心法による分画により18Sよりやや重い画分に得られるmRNAおよびその調製法を提供するものである。

本発明のmRNAは、上記したようにダイズ貯蔵タンパク質に対応し、ショ糖密度勾配遠心法やゲル通過法による分画ならびにアガロース電気泳動法により18Sよりやや重い部分として得られるものであり、このmRNAはダイズ種子より抽出分離することによって製造できる。

本発明に用いるmRNAの材料としては種々の過程、たとえば登熟期にあるダイズ種子を使用できる。

ダイズ種子よりダイズ貯蔵タンパク質に対応するmRNAを抽出するには種子の種類を問わず常法によって行なえばよい。たとえば組織を2~5容のNP-40, SDS, Triton X-100などの界面活性剤とフェノール溶液を混合してホモゲナイザーや凍結融解などの物理的方法を用いて細胞を破碎、可溶化し、遠心した後の上清に冷エタノールを加えてRNAを沈殿させる。

また、必要に応じてダイズ貯蔵タンパク質に対する抗体を用いてダイズ貯蔵タンパク質合成途上のポリソームを沈降せしめ、これによりmRNA

トロでcDNAを合成し、適当なベクターなどに組み込んで微生物あるいは植物等でダイズ貯蔵タンパク質を生産することを可能ならしめることにある。

このようなcDNAの合成は通常、試験管内で次のような方法で行なうことができる。mRNAを誘型としてオリゴdTをプライマーとしてdATP, dGTP, dCTP, dTTPの存在下で逆転写酵素によりmRNAと相補的な単鎖cDNAを合成し、アルカリ処理で誘型mRNAを分解・除去した後、オリゴdCを付加し、次いでオリゴdGをプライマーとして単鎖cDNAを誘型にして逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼを用いて二重鎖cDNAを合成する。このようにして得られたDNA両端を必要によりエキソヌクレアーゼで処理し、それぞれに適当なDNAを接続あるいはアニーリング可能な組合せの塩基を複数個重合せしめる。しかし後、これを微生物ベクターに組み込む。組み込む方法はベクターを適当な制限酵素で切断し、必要により適当なり

を界面活性剤などで抽出する方法を行なうことができる。

また、本発明のmRNAの精製については、オリゴdT-セルロース、ポリU-セファロースなどの吸着カラムによる精製法、等速(isokinetic)なショ糖密度勾配遠心法による分画等によって行なうことができる。このような精製操作により本発明のmRNAは18Sよりやや重い部分として得られる。

上記の如くして得られたmRNAが目的とするダイズ貯蔵タンパク質に対応するものであることを確認するためには、mRNAをタンパク質に翻訳させ、その抗体等を用いてそのタンパク質を同定する等の方法を行なえばよい。たとえばmRNAをタンパク質に翻訳するのによく用いられる系であるReticulocyte-lyzate(網状赤血球ライゼート), Wheat germ(コムギ胚芽)などの無細胞系でタンパク質に翻訳させることが行なわれる。

かくして得られたダイズ貯蔵タンパク質mRNAの最大の利用法は、これらのmRNAよりインビ

ンカーまたはアニーリング可能な組み合せの塩基を複数個重合せしめる。このように加工した二重鎖DNAとベクター-DNAを混合し、リガーゼを用いて接続せしめる。

得られた組み換えDNAはベクターの宿主微生物に導入する。宿主微生物としてはエシェリヒア・コリ等のエシェリヒア属の微生物、バチルス・ズブチリス等のバチルス属の微生物、サッカロミセス・セレビシエ等のサッカロミセス属の微生物などが好適である。これらの微生物に使用されるベクターを以下に例示する。(蛋白質核酸酵素26巻4号(1981)参照) EK系プラスミドベクター(ストリンジエンド型)のpSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41等、EK系プラスミドベクター(リラックスド型)のCaIE1, pVH51, pAC105, RSF2124, pCR1, pMB9, BR313, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACYC184,

λ dal 等、 λ gt系ファージベクターの λ gt・ λ c.. λ gt・ λ B、 λ WES・ λ B'、 λ ZJvir・ λ B'、 λ ALO・ λ B、 λ WES・ λ s622、 λ Dam等、シャロンベクターのシャロン4A、シャロン3A、シャロン16A、シャロン13A、シャロン14A、シャロン15A、シャロン8、シャロン10、シャロン17、シャロン20等、チオライス (Tlollais) グループベクターの L512、 λ ZEQS、 λ ZYV5φ、 λ ZUVφ2、 λ ZUVφ3、 λ YEQSφ1、 λ YEQSφ、 λ YEQSφ3、 λ Bam、 λ Sst等、枯草菌のプラスミドベクター pTA1015、pLS15、pTA1020、pLS28、pLS13、pTA1050、pTA1060、pTA1030、pTA1031等、スタフィロコッカス由来のプラスミドベクター - pT127、pC194、pC221、pC223、pUB112、pUB110、pSA0501、pSA2100、pE194、pTP4、pTP5等、酵母ベクター pJDB219、YE p13、YRp7、YIp1、pYC、pTC2。微生物のベクター、たとえば pBR322 などの Pst I あるいは Eco R1 site など目的に応じた個

場合にも本発明は全く同様に実施できるものであり、本発明の範囲に含まれる。

実施例 1

(1) 完熟ダイズからグリシニン (ダイズ主要貯蔵タンパク質の1つ) を精製し、酸性 (以下、A と略称する。) サブユニットを分離、精製する。この A サブユニットは分子量約35~40Kで、互いに免疫化学的に強い交叉性を示す。そこで、個々の A サブユニットに特異的な抗血清を調製する。抗血清の調製法としては、たとえば特定サブユニットでウサギに十分免疫 (hyperimmunization) して得た抗血清に、他の酸性サブユニットタンパクの凍結乾燥粉末を加えて吸収操作を繰り返す方法が適用できる。特異性の検定は、オクテルローニイのゲル内二重拡散法とウエスタンプロット法によった。

(2) 登熟中期 (開花後38日目) のダイズ子葉から膜結合型ポリソームを調製し、SDS-フェノール法とポリU-セファロースカラム法で mRNA を精製する。一方、同じ時期の子葉から同様にし

所に組み込み、適当な宿主にトランスポームしてそのダイズ貯蔵タンパク質を宿主内で発現させることができる。

得られた mRNA がダイズ貯蔵タンパク質に対応する遺伝情報を有していることを以下の方法により確認する。

Reticulocyte lysate あるいは Wheat germ の系を用い Positive hybrid selection and invitro translation 法によりダイズ貯蔵タンパク質であることを同定する。

また、植物において T-DNA tcr 領域を含む pAL1050ベクターを用いて遺伝子を植物に導入する。

組み換え DNA を挿入する場合 tcr のリーダー配列に In-frame に接続し、終止コドン領域も tcr のものを利用する。

上述のようにダイズ種子より本発明の mRNA を調製する方法を以下の実施例により詳しく説明する。なお、本実施例に示す以下のダイズ種子より得られる貯蔵タンパク質に対応する mRNA の

て全 mRNA を調製する。この全 mRNA 標品の一部はショ糖密度勾配遠心法 (ショ糖10% (w/w) ~30% (w/w)) により分画し、赤血球無細胞タンパク合成系における翻訳産物の免疫化学的解析でグリシニン mRNA 濃縮画分を同定する。

(3) 上記 (2) の全 mRNA に対する cDNA ライブラリーを以下に記述する方法に従って作製する。

1) ss-cDNA の合成と綴型 mRNA のアルカリ分解シリコナ化したエッペンドルチューブ (1.5mL) に $10\mu\text{L}$ の X10 cDNA 緩衝液 (0.5 M トリス-塩酸、1.4 M 塩化カリウム、0.8 M 酢酸マグネシウム)、 $3\mu\text{L}$ の RNasin (生化学工業 40u/ μL)、 $5\mu\text{L}$ の dATP、 $5\mu\text{L}$ の dGTP、 $4\mu\text{L}$ の dCTP および dTTP、 $24\mu\text{L}$ のオリゴ (dT) ₁₂₋₁₈ (P-L Biochemicals 社製、0.2 mg/ μL)、 $8\mu\text{L}$ のアクチノマイシン D ($0.4\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、 $1\mu\text{L}$ の 0.1 M DTT、 $6\mu\text{L}$ の (α - ^{32}P) dATP および $10\mu\text{L}$ の mRNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、65°C、10分間処理した

後、急冷したもの)をこの順番に加えて混合して1秒間遠心し、液を底に集める。

42℃で2分間保温し後、20μlのAMV逆転写酵素を加えて軽く混合し、1秒間遠心してこの混液(100μl)を42℃で60分間保温する。

反応液に20μlの5M塩化ナトリウム、16μlの250mMEDTA、2μlの20%SDSおよび62μlの蒸留水を加えて反応を止める。

これにフェノール混液(10mMトリス-塩酸(pH8.3)-2mMEDTAで飽和したフェノール液)200μlを加えて微しく振盪する。

遠心して水層をとり、残りのフェノール層に122μlの蒸留水、48μlの5M塩化ナトリウム溶液を加えて再抽出し、先の水層と合わせてエーテル処理をして混入したフェノールを除去した後、30μlの酢酸カリウム(pH5.0)と600μlの冷エタノールを加えてエタノール沈殿する(ドライアイス-エタノール中で30分間または-70℃で1時間)。

この操作により約3~5μgのcDNAが得ら

れる。このss-cDNAを減圧乾燥し、45μlの蒸留水を加えて溶解する。

これに5μlの5N水酸化ナトリウム溶液を加えて混合し、1秒間遠心して液をチューブの底に集めて25℃で一晩保温し、mRNAを分解する。

50μlのHepes-KOH(pH7.4)緩衝液を加えた後、ウルトロゲルA c A44のカラム(ゲルベットの高さ28cm)にのせて約0.6mlずつ分画する。void volume 西分(この条件ではフラクション番号6~8、GMサーベイメーターでチェックまたは液体シンチレーションカウンターを用いてCerenkov法で測定)を集め。

この西分に1/10容量の3M酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて-70℃で1時間放置後遠心沈殿させ、2回70%エタノールで沈殿物を洗い(沈殿物をはがさないように静かにエタノールを重層し、10分間遠心しながらrinseする)、減圧乾燥する。

ii) ss-cDNAの3'-OH末端へのdCホモポリマーの付加

i) で調製乾燥したss-cDNA(シリコナイズしたエッペンドルフチューブに入っている)に25μlの蒸留水を加えて溶解し、遠心して底に集めて65℃で10分間処理し、急冷する。再び1秒間遠心し、これに5μlのX10TdT緩衝液(1.4Mカコジル酸カリウム(pH7.6)、0.6Mトリス塩基(19.3gのカコジル酸(free acid)と7.2gのトリズマ・ベース(Sigma社製)を50mlの再蒸留水に溶かし、水酸化カリウムの粉末を加えてpHを7.6に調整、滅菌する)、5μlの塩化コバルト、5μlのDTTおよび5μlのdCTPを加え十分に混合し遠心する。

これに5μlのTdT(4u/μl)を加えて軽く混合し、15℃で10分間保温する。この反応混液に10μlの5M塩化ナトリウム、4μlの250mMEDTA、36μlの蒸留水を加え70℃で5分間熱処理する。

フェノール抽出後エタノール沈殿、洗浄後乾燥する。

iii) ds-cDNAの作製

上記ii)で作製した3'末端にdCホモポリマーを付加したss-cDNA標品(シリコナイズしたエッペンドルフチューブ中で乾燥保存したもの)に26μlの蒸留水を加えて十分に溶解し、68℃、5分間処理後急冷する。

1秒間遠心後、10μlのX10cDNA緩衝液、1μlのDTT、10μlのdATP、dGTP、dCTPおよびdTTP、15μlのオリゴ(dG)₁₃を加えて混合後遠心し、次いで13μlの逆転写酵素(5.8u/μl)を加えて42℃で1時間保温する。

反応液に20μlの5M塩化ナトリウム、8μlの250mMEDTA、2μlの20%SDSおよび70μlの蒸留水を加えて反応を停止させる。

常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および乾燥後、40μlの蒸留水を加えて溶解し、62℃、5分間処理後急冷し、遠心する。

これにX10Klenow緩衝液(0.67mMK-リン酸緩衝液(pH7.4)、67mM塩化マグネシウム、10mMDTT)を10μl、dATP、dGTP、

d C T P および d T T P の各 $10 \mu\ell$ ずつを加えてよく混合した後、DNAポリメラーゼ I (Klenow 酵素, $5 \text{ u} / \mu\ell$) を $10 \mu\ell$ 加えて 37°C で 1 時間反応させる。

$40 \mu\ell$ の 5 M 塩化ナトリウム, $16 \mu\ell$ の 250 mM EDTA, $4 \mu\ell$ の 20% SDS および $140 \mu\ell$ の蒸留水を加えて反応を止めた後、フェノール抽出、エタノール沈殿を常法に従って行なう。必要とあれば、この段階でゲル電気泳動または中性シス糖密度勾配法により低分子の ds - c DNA を除去することもできる。

ds - c DNA に $100 \mu\ell$ の蒸留水を加えて溶解し、ウルトロゲル A c A 44 のカラム (ゲルベッドの高さ 28cm) にのせて約 $0.6 \mu\ell$ ずつ分画し void volume 西分を集める (溶出パターンは液体シンチレーションカウンターを用いた Gereakov 法で測定する)。

この西分に $1/10$ 量の 3 M 酢酸カリウム、2倍量の冷エタノールを加えて -70°C で 1 時間放置後、生じた ds - c DNA の沈殿を遠心乾燥により回

ゴ (d G), (d C) を加えて混合し、 68°C 、5 分間処理した後、 43°C にした恒温水槽中に移し 2 時間保溫する。

恒温槽のスイッチを切り、少なくとも 2 時間以上 (一晩そのまましておいてもよい) 放置して室温まで下げた後、チューブを 4°C に保存する。

vi) 形質転換 (トランスフォーメーション)

Dagert と Ehrlich の方法により RR 1 を宿主として $8.2 \times 10^6 \sim 1.4 \times 10^7$ 個形質転換株/ μg pBR 322 DNA の転換効率を得た。

(4) (2) のグリシニン中間サブユニット mRNA の濃縮画分に対する ^{32}P 標識 c DNA を作製しプローブとする。

(5) 上記 (4) で作製したプローブを用いて (3) の c DNA ライブラリーの中からグリシニンサブユニットクローナーをコロニーハイブリダイゼイション法で選別する。1023個のクローナーのうち 22 個が陽性であった。

6) 上記 (5) で得た 22 個のクローナーの中から挿入部分の長さが 1 kb 以上のクローナー (16 個) を選

り、洗浄、減圧乾燥する。

iv) プラスマドへ挿入のための ds - c DNA の末端加工

上記 (3) で調製した ds - c DNA に $37 \mu\ell$ の蒸留水を加えて溶解し、 $5 \mu\ell$ の X10 T d T 緩衝液、 $5 \mu\ell$ の d CTD を加えて十分混合した後、 $3 \mu\ell$ の T d T を加えて 37°C で 5 分間保溫する。

反応後、 $10 \mu\ell$ の 5 M 塩化ナトリウム、 $4 \mu\ell$ の 250 mM EDTA および $36 \mu\ell$ の蒸留水を加えて 70°C で 5 分間処理した後、常法に従ってフェノール抽出、エタノール沈殿、洗浄および減圧乾燥を行なう。

v) PstI 切断 3' 末端オリゴ d G 付加 pBR 322 とのアニーリング

ds - c DNA 溶液 ($450 \mu\ell$) に $50 \mu\ell$ の X10 アニーリング緩衝液 (0.1 M トリス - 塩酸 (pH 7.5)、1 M 塩化ナトリウム、10 mM EDTA) を加えて十分混合し、その $100 \mu\ell$ をとりエッペンドルフチューブ (1.5 ml, シリコナライズしたもの) に入れる。これに $1 \mu\ell$ の pBR 322 (オリ

ビ "positive hybrid selection and invitro translation" 法によりグリシニン c DNA クローンを同定した。このうちの 1 つは約 2 kb の挿入部分を持っていた。このクローンをプローブとしたノーザンプロットハイブリダイゼイションの結果からグリシニン mRNA の長さは約 2.2 kb であり、作製された c DNA は完全長に近い。

クローニングした c DNA のうちの一つグリシニン A, B, サブユニット c DNA の構造は第 1 表の通りであった。

実施例 2

実施例 1 と同様の方法で得られたもう一つのグリシニン A, A, B, サブユニット c DNA の構造は第 2 表の構造であった。



1
(ダイズグリシニンA,B,c-DNAの塩基配列)

AATTCAACCTCCCT₃₀AAACCTTATT₂₀AACACTTCC₁₀TAGTTCAATA₁₀G₁₀C₁₀G₁₀
 T₄₀C₂₀T₃₀C₄₀T₅₀C₆₀T₇₀C₈₀T₉₀C₁₀₀T₁₁₀C₁₂₀T₁₃₀C₁₄₀T₁₅₀C₁₆₀
 A₁₇₀T₁₈₀C₁₉₀T₂₀₀C₂₁₀A₂₂₀T₂₃₀C₂₄₀A₂₅₀T₂₆₀C₂₇₀A₂₈₀T₂₉₀C₃₀₀A₃₁₀T₃₂₀
 G₃₃₀C₃₄₀A₃₅₀T₃₆₀C₃₇₀A₃₈₀T₃₉₀C₄₀₀A₄₁₀T₄₂₀C₄₃₀A₄₄₀T₄₅₀C₄₆₀A₄₇₀T₄₈₀
 C₄₉₀A₅₀₀T₅₁₀C₅₂₀A₅₃₀T₅₄₀C₅₅₀A₅₆₀T₅₇₀C₅₈₀A₅₉₀T₆₀₀C₆₁₀A₆₂₀T₆₃₀
 C₆₄₀G₆₅₀A₆₆₀T₆₇₀C₆₈₀A₆₉₀T₇₀₀C₇₁₀A₇₂₀T₇₃₀C₇₄₀A₇₅₀T₇₆₀C₇₇₀A₇₈₀T₇₉₀
 C₈₀₀G₈₁₀A₈₂₀T₈₃₀C₈₄₀A₈₅₀T₈₆₀C₈₇₀A₈₈₀T₈₉₀C₉₀₀A₉₁₀T₉₂₀C₉₃₀A₉₄₀T₉₅₀
 C₉₆₀G₉₇₀A₉₈₀T₉₉₀C₁₀₀₀A₁₀₁₀T₁₀₂₀C₁₀₃₀A₁₀₄₀T₁₀₅₀C₁₀₆₀A₁₀₇₀T₁₀₈₀C₁₀₉₀A₁₁₀₀T₁₁₁₀
 C₁₁₂₀G₁₁₃₀A₁₁₄₀T₁₁₅₀C₁₁₆₀A₁₁₇₀T₁₁₈₀C₁₁₉₀A₁₂₀₀T₁₂₁₀C₁₂₂₀A₁₂₃₀T₁₂₄₀C₁₂₅₀A₁₂₆₀T₁₂₇₀
 A₁₂₈₀G₁₂₉₀A₁₃₀₀T₁₃₁₀C₁₃₂₀A₁₃₃₀T₁₃₄₀C₁₃₅₀A₁₃₆₀T₁₃₇₀C₁₃₈₀A₁₃₉₀T₁₄₀₀C₁₄₁₀A₁₄₂₀T₁₄₃₀
 A₁₄₄₀C₁₄₅₀T₁₄₆₀C₁₄₇₀A₁₄₈₀T₁₄₉₀C₁₅₀₀A₁₅₁₀T₁₅₂₀C₁₅₃₀A₁₅₄₀T₁₅₅₀C₁₅₆₀A₁₅₇₀T₁₅₈₀
 C₁₅₉₀G₁₆₀₀A₁₆₁₀T₁₆₂₀C₁₆₃₀A₁₆₄₀T₁₆₅₀C₁₆₆₀A₁₆₇₀T₁₆₈₀C₁₆₉₀A₁₇₀₀T₁₇₁₀C₁₇₂₀A₁₇₃₀T₁₇₄₀-Poly(A)

C₁₇₅₀G₁₇₆₀A₁₇₇₀T₁₇₈₀C₁₇₉₀A₁₈₀₀T₁₈₁₀C₁₈₂₀A₁₈₃₀T₁₈₄₀C₁₈₅₀A₁₈₆₀T₁₈₇₀C₁₈₈₀A₁₈₉₀T₁₉₀₀C₁₉₁₀A₁₉₂₀T₁₉₃₀C₁₉₄₀A₁₉₅₀T₁₉₆₀
 C₁₉₇₀G₁₉₈₀A₁₉₉₀T₂₀₀₀C₂₀₁₀A₂₀₂₀T₂₀₃₀C₂₀₄₀A₂₀₅₀T₂₀₆₀C₂₀₇₀A₂₀₈₀T₂₀₉₀C₂₁₀₀A₂₁₁₀T₂₁₂₀C₂₁₃₀A₂₁₄₀T₂₁₅₀C₂₁₆₀A₂₁₇₀T₂₁₈₀C₂₁₉₀A₂₂₀₀T₂₂₁₀C₂₂₂₀A₂₂₃₀T₂₂₄₀C₂₂₅₀A₂₂₆₀T₂₂₇₀C₂₂₈₀A₂₂₉₀T₂₃₀₀C₂₃₁₀A₂₃₂₀T₂₃₃₀C₂₃₄₀A₂₃₅₀T₂₃₆₀C₂₃₇₀A₂₃₈₀T₂₃₉₀C₂₄₀₀A₂₄₁₀T₂₄₂₀C₂₄₃₀A₂₄₄₀T₂₄₅₀C₂₄₆₀A₂₄₇₀T₂₄₈₀C₂₄₉₀A₂₅₀₀T₂₅₁₀C₂₅₂₀A₂₅₃₀T₂₅₄₀C₂₅₅₀A₂₅₆₀T₂₅₇₀C₂₅₈₀A₂₅₉₀T₂₆₀₀C₂₆₁₀A₂₆₂₀T₂₆₃₀C₂₆₄₀A₂₆₅₀T₂₆₆₀C₂₆₇₀A₂₆₈₀T₂₆₉₀C₂₇₀₀A₂₇₁₀T₂₇₂₀C₂₇₃₀A₂₇₄₀T₂₇₅₀C₂₇₆₀A₂₇₇₀T₂₇₈₀C₂₇₉₀A₂₈₀₀T₂₈₁₀C₂₈₂₀A₂₈₃₀T₂₈₄₀C₂₈₅₀A₂₈₆₀T₂₈₇₀C₂₈₈₀A₂₈₉₀T₂₉₀₀C₂₉₁₀A₂₉₂₀T₂₉₃₀C₂₉₄₀A₂₉₅₀T₂₉₆₀C₂₉₇₀A₂₉₈₀T₂₉₉₀C₃₀₀₀A₃₀₁₀T₃₀₂₀C₃₀₃₀A₃₀₄₀T₃₀₅₀C₃₀₆₀A₃₀₇₀T₃₀₈₀C₃₀₉₀A₃₁₀₀T₃₁₁₀C₃₁₂₀A₃₁₃₀T₃₁₄₀C₃₁₅₀A₃₁₆₀T₃₁₇₀C₃₁₈₀A₃₁₉₀T₃₂₀₀C₃₂₁₀A₃₂₂₀T₃₂₃₀C₃₂₄₀A₃₂₅₀T₃₂₆₀C₃₂₇₀A₃₂₈₀T₃₂₉₀C₃₂₀₀A₃₃₁₀T₃₃₂₀C₃₃₃₀A₃₃₄₀T₃₃₅₀C₃₃₆₀A₃₃₇₀T₃₃₈₀C₃₃₉₀A₃₄₀₀T₃₄₁₀C₃₄₂₀A₃₄₃₀T₃₄₄₀C₃₄₅₀A₃₄₆₀T₃₄₇₀C₃₄₈₀A₃₄₉₀T₃₅₀₀C₃₅₁₀A₃₅₂₀T₃₅₃₀C₃₅₄₀A₃₅₅₀T₃₅₆₀C₃₅₇₀A₃₅₈₀T₃₅₉₀C₃₆₀₀A₃₆₁₀T₃₆₂₀C₃₆₃₀A₃₆₄₀T₃₆₅₀C₃₆₆₀A₃₆₇₀T₃₆₈₀C₃₆₉₀A₃₇₀₀T₃₇₁₀C₃₇₂₀A₃₇₃₀T₃₇₄₀C₃₇₅₀A₃₇₆₀T₃₇₇₀C₃₇₈₀A₃₇₉₀T₃₈₀₀C₃₈₁₀A₃₈₂₀T₃₈₃₀C₃₈₄₀A₃₈₅₀T₃₈₆₀C₃₈₇₀A₃₈₈₀T₃₈₉₀C₃₈₀₀A₃₉₁₀T₃₉₂₀C₃₉₃₀A₃₉₄₀T₃₉₅₀C₃₉₆₀A₃₉₇₀T₃₉₈₀C₃₉₉₀A₃₀₀₀T₃₀₁₀C₃₀₂₀A₃₀₃₀T₃₀₄₀C₃₀₅₀A₃₀₆₀T₃₀₇₀C₃₀₈₀A₃₀₉₀T₃₁₀₀C₃₁₁₀A₃₁₂₀T₃₁₃₀C₃₁₄₀A₃₁₅₀T₃₁₆₀C₃₁₇₀A₃₁₈₀T₃₁₉₀C₃₁₀₀A₃₂₁₀T₃₂₂₀C₃₂₃₀A₃₂₄₀T₃₂₅₀C₃₂₆₀A₃₂₇₀T₃₂₈₀C₃₂₉₀A₃₃₀₀T₃₃₁₀C₃₃₂₀A₃₃₃₀T₃₃₄₀C₃₃₅₀A₃₃₆₀T₃₃₇₀C₃₃₈₀A₃₃₉₀T₃₄₀₀C₃₄₁₀A₃₄₂₀T₃₄₃₀C₃₄₄₀A₃₄₅₀T₃₄₆₀C₃₄₇₀A₃₄₈₀T₃₄₉₀C₃₅₀₀A₃₅₁₀T₃₅₂₀C₃₅₃₀A₃₅₄₀T₃₅₅₀C₃₅₆₀A₃₅₇₀T₃₅₈₀C₃₅₉₀A₃₅₀₀T₃₆₁₀C₃₆₂₀A₃₆₃₀T₃₆₄₀C₃₆₅₀A₃₆₆₀T₃₆₇₀C₃₆₈₀A₃₆₉₀T₃₇₀₀C₃₇₁₀A₃₇₂₀T₃₇₃₀C₃₇₄₀A₃₇₅₀T₃₇₆₀C₃₇₇₀A₃₇₈₀T₃₇₉₀C₃₇₀₀A₃₈₁₀T₃₈₂₀C₃₈₃₀A₃₈₄₀T₃₈₅₀C₃₈₆₀A₃₈₇₀T₃₈₈₀C₃₈₉₀A₃₈₀₀T₃₉₁₀C₃₉₂₀A₃₉₃₀T₃₉₄₀C₃₉₅₀A₃₉₆₀T₃₉₇₀C₃₉₈₀A₃₉₉₀T₃₀₀₀C₃₀₁₀A₃₀₂₀T₃₀₃₀C₃₀₄₀A₃₀₅₀T₃₀₆₀C₃₀₇₀A₃₀₈₀T₃₀₉₀C₃₀₀₀A₃₁₁₀T₃₁₂₀C₃₁₃₀A₃₁₄₀T₃₁₅₀C₃₁₆₀A₃₁₇₀T₃₁₈₀C₃₁₉₀A₃₁₀₀T₃₂₁₀C₃₂₂₀A₃₂₃₀T₃₂₄₀C₃₂₅₀A₃₂₆₀T₃₂₇₀C₃₂₈₀A₃₂₉₀T₃₂₀₀C₃₃₁₀A₃₃₂₀T₃₃₃₀C₃₃₄₀A₃₃₅₀T₃₃₆₀C₃₃₇₀A₃₃₈₀T₃₃₉₀C₃₃₀₀A₃₄₁₀T₃₄₂₀C₃₄₃₀A₃₄₄₀T₃₄₅₀C₃₄₆₀A₃₄₇₀T₃₄₈₀C₃₄₉₀A₃₄₀₀T₃₅₁₀C₃₅₂₀A₃₅₃₀T₃₅₄₀C₃₅₅₀A₃₅₆₀T₃₅₇₀C₃₅₈₀A₃₅₉₀T₃₅₀₀C₃₆₁₀A₃₆₂₀T₃₆₃₀C₃₆₄₀A₃₆₅₀T₃₆₆₀C₃₆₇₀A₃₆₈₀T₃₆₉₀C₃₆₀₀A₃₇₁₀T₃₇₂₀C₃₇₃₀A₃₇₄₀T₃₇₅₀C₃₇₆₀A₃₇₇₀T₃₇₈₀C₃₇₉₀A₃₇₀₀T₃₈₁₀C₃₈₂₀A₃₈₃₀T₃₈₄₀C₃₈₅₀A₃₈₆₀T₃₈₇₀C₃₈₈₀A₃₈₉₀T₃₈₀₀C₃₉₁₀A₃₉₂₀T₃₉₃₀C₃₉₄₀A₃₉₅₀T₃₉₆₀C₃₉₇₀A₃₉₈₀T₃₉₉₀C₃₀₀₀A₃₀₁₀T₃₀₂₀C₃₀₃₀A₃₀₄₀T₃₀₅₀C₃₀₆₀A₃₀₇₀T₃₀₈₀C₃₀₉₀A₃₀₀₀T₃₁₁₀C₃₁₂₀A₃₁₃₀T₃₁₄₀C₃₁₅₀A₃₁₆₀T₃₁₇₀C₃₁₈₀A₃₁₉₀T₃₁₀₀C₃₂₁₀A₃₂₂₀T₃₂₃₀C₃₂₄₀A₃₂₅₀T₃₂₆₀C₃₂₇₀A₃₂₈₀T₃₂₉₀C₃₂₀₀A₃₃₁₀T₃₃₂₀C₃₃₃₀A₃₃₄₀T₃₃₅₀C₃₃₆₀A₃₃₇₀T₃₃₈₀C₃₃₉₀A₃₃₀₀T₃₄₁₀C₃₄₂₀A₃₄₃₀T₃₄₄₀C₃₄₅₀A₃₄₆₀T₃₄₇₀C₃₄₈₀A₃₄₉₀T₃₄₀₀C₃₅₁₀A₃₅₂₀T₃₅₃₀C₃₅₄₀A₃₅₅₀T₃₅₆₀C₃₅₇₀A₃₅₈₀T₃₅₉₀C₃₅₀₀A₃₆₁₀T₃₆₂₀C₃₆₃₀A₃₆₄₀T₃₆₅₀C₃₆₆₀A₃₆₇₀T₃₆₈₀C₃₆₉₀A₃₆₀₀T₃₇₁₀C₃₇₂₀A₃₇₃₀T₃₇₄₀C₃₇₅₀A₃₇₆₀T₃₇₇₀C₃₇₈₀A₃₇₉₀T₃₇₀₀C₃₈₁₀A₃₈₂₀T₃₈₃₀C₃₈₄₀A₃₈₅₀T₃₈₆₀C₃₈₇₀A₃₈₈₀T₃₈₉₀C₃₈₀₀A₃₉₁₀T₃₉₂₀C₃₉₃₀A₃₉₄₀T₃₉₅₀C₃₉₆₀A₃₉₇₀T₃₉₈₀C₃₉₉₀A₃₀₀₀T₃₀₁₀C₃₀₂₀A₃₀₃₀T₃₀₄₀C₃₀₅₀A₃₀₆₀T₃₀₇₀C₃₀₈₀A₃₀₉₀T₃₀₀₀C₃₁₁₀A₃₁₂₀T₃₁₃₀C₃₁₄₀A₃₁₅₀T₃₁₆₀C₃₁₇₀A₃₁₈₀T₃₁₉₀C₃₁₀₀A₃₂₁₀T₃₂₂₀C₃₂₃₀A₃₂₄₀T₃₂₅₀C₃₂₆₀A₃₂₇₀T₃₂₈₀C₃₂₉₀A₃₂₀₀T₃₃₁₀C₃₃₂₀A₃₃₃₀T₃₃₄₀C₃₃₅₀A₃₃₆₀T₃₃₇₀C₃₃₈₀A₃₃₉₀T₃₃₀₀C₃₄₁₀A₃₄₂₀T₃₄₃₀C₃₄₄₀A₃₄₅₀T₃₄₆₀C₃₄₇₀A₃₄₈₀T₃₄₉₀C₃₄₀₀A₃₅₁₀T₃₅₂₀C₃₅₃₀A₃₅₄₀T₃₅₅₀C₃₅₆₀A₃₅₇₀T₃₅₈₀C₃₅₉₀A₃₅₀₀T₃₆₁₀C₃₆₂₀A₃₆₃₀T₃₆₄₀C₃₆₅₀A₃₆₆₀T₃₆₇₀C₃₆₈₀A₃₆₉₀T₃₆₀₀C₃₇₁₀A₃₇₂₀T₃₇₃₀C₃₇₄₀A₃₇₅₀T₃₇₆₀C₃₇₇₀A₃₇₈₀T₃₇₉₀C₃₇₀₀A₃₈₁₀T₃₈₂₀C₃₈₃₀A₃₈₄₀T₃₈₅₀C₃₈₆₀A₃₈₇₀T₃₈₈₀C₃₈₉₀A₃₈₀₀T₃₉₁₀C₃₉₂₀A₃₉₃₀T₃₉₄₀C₃₉₅₀A₃₉₆₀T₃₉₇₀C₃₉₈₀A₃₉₉₀T₃₀₀₀C₃₀₁₀A₃₀₂₀T₃₀₃₀C₃₀₄₀A₃₀₅₀T₃₀₆₀C₃₀₇₀A₃₀₈₀T₃₀₉₀C₃₀₀₀A₃₁₁₀T₃₁₂₀C₃₁₃₀A₃₁₄₀T₃₁₅₀C₃₁₆₀A₃₁₇₀T₃₁₈₀C₃₁₉₀A₃₁₀₀T₃₂₁₀C₃₂₂₀A₃₂₃₀T₃₂₄₀C₃₂₅₀A₃₂₆₀T₃₂₇₀C₃₂₈₀A₃₂₉₀T₃₂₀₀C₃₃₁₀A₃₃₂₀T₃₃₃₀C₃₃₄₀A₃₃₅₀T₃₃₆₀C₃₃₇₀A₃₃₈₀T₃₃₉₀C₃₃₀₀A₃₄₁₀T₃₄₂₀C₃₄₃₀A₃₄₄₀T₃₄₅₀C₃₄₆₀A₃₄₇₀T₃₄₈₀C₃₄₉₀A₃₄₀₀T₃₅₁₀C₃₅₂₀A₃₅₃₀T₃₅₄₀C₃₅₅₀A₃₅₆₀T₃₅₇₀C₃₅₈₀A₃₅₉₀T₃₅₀₀C₃₆₁₀A₃₆₂₀T₃₆₃₀C₃₆₄₀A₃₆₅₀T₃₆₆₀C₃₆₇₀A₃₆₈₀T₃₆₉₀C₃₆₀₀A₃₇₁₀T₃₇₂₀C₃₇₃₀A₃₇₄₀T₃₇₅₀C₃₇₆₀A₃₇₇₀T₃₇₈₀C₃₇₉₀A₃₇₀₀T₃₈₁₀C₃₈₂₀A₃₈₃₀T₃₈₄₀C₃₈₅₀A₃₈₆₀T₃₈₇₀C₃₈₈₀A₃₈₉₀T₃₈₀₀C₃₉₁₀A₃₉₂₀T₃₉₃₀C₃₉₄₀A₃₉₅₀T₃₉₆₀C₃₉₇₀A₃₉₈₀T₃₉₉₀C₃₀₀₀A₃₀₁₀T₃₀₂₀C₃₀₃₀A₃₀₄₀T₃₀₅₀C₃₀₆₀A₃₀₇₀T₃₀₈₀C₃₀₉₀A₃₀₀₀T₃₁₁₀C₃₁₂₀A₃₁₃₀T₃₁₄₀C₃₁₅₀A₃₁₆₀T₃₁₇₀C₃₁₈₀A₃₁₉₀T₃₁₀₀C₃₂₁₀A₃₂₂₀T₃₂₃₀C₃₂₄₀A₃₂₅₀T₃₂₆₀C₃₂₇₀A₃₂₈₀T₃₂₉₀C₃₂₀₀A₃₃₁₀T₃₃₂₀C₃₃₃₀A₃₃₄₀T₃₃₅₀C₃₃₆₀A₃₃₇₀T₃₃₈₀C₃₃₉₀A₃₃₀₀T₃₄₁₀C₃₄₂₀A₃₄₃₀T₃₄₄₀C₃₄₅₀A₃₄₆₀T₃₄₇₀C₃₄₈₀A₃₄₉₀T₃₄₀₀C₃₅₁₀A₃₅₂₀T₃₅₃₀C₃₅₄₀A₃₅₅₀T₃₅₆₀C₃₅₇₀A₃₅₈₀T₃₅₉₀C₃₅₀₀A₃₆₁₀T₃₆₂₀C₃₆₃₀A₃₆₄₀T₃₆₅₀C₃₆₆₀A₃₆₇₀T₃₆₈₀C₃₆₉₀A₃₆₀₀T₃₇₁₀C₃₇₂₀A₃₇₃₀T₃₇₄₀C₃₇₅₀A₃₇₆₀T₃₇₇₀C₃₇₈₀A₃₇₉₀T₃₇₀₀C₃₈₁₀A₃₈₂₀T₃₈₃₀C₃₈₄₀A₃₈₅₀T₃₈₆₀C₃₈₇₀A₃₈₈₀T₃₈₉₀C₃₈₀₀A₃₉₁₀T₃₉₂₀C₃₉₃₀A₃₉₄₀T₃₉₅₀C₃₉₆₀A₃₉₇₀T₃₉₈₀C₃₉₉₀A₃₀₀₀T₃₀₁₀C₃₀₂₀A₃₀₃₀T₃₀₄₀C₃₀₅₀A₃₀₆₀T₃₀₇₀C₃₀₈₀A₃₀₉₀T₃₀₀₀C₃₁₁₀A₃₁₂₀T₃₁₃₀C₃₁₄₀A₃₁₅₀T₃₁₆₀C₃₁₇₀A₃₁₈₀T₃₁₉₀C₃₁₀₀A₃₂₁₀T₃₂₂₀C₃₂₃₀A₃₂₄₀T₃₂₅₀C₃₂₆₀A₃₂₇₀T₃₂₈₀C₃₂₉₀A₃₂₀₀T₃₃₁₀C₃₃₂₀A₃₃₃₀T₃₃₄₀C₃₃₅₀A₃₃₆₀T₃₃₇₀C₃₃₈₀A₃₃₉₀T₃₃₀₀C₃₄₁₀A₃₄₂₀T₃₄₃₀C₃₄₄₀A₃₄₅₀T₃₄₆₀C₃₄₇₀A₃₄₈₀T₃₄₉₀C₃₄₀₀A₃₅₁₀T₃₅₂₀C₃₅₃₀A₃₅₄₀T₃₅₅₀C₃₅₆₀A₃₅₇₀T₃₅₈₀C₃₅₉₀A₃₅₀₀T₃₆₁₀C₃₆₂₀A₃₆₃₀T₃₆₄₀C₃₆₅₀A₃₆₆₀T₃₆₇₀C₃₆₈₀A₃₆₉₀T₃₆₀₀C₃₇₁₀A₃₇₂₀T₃₇₃₀C₃₇₄₀A₃₇₅₀T₃₇₆₀C₃₇₇₀A₃₇₈₀T₃₇₉₀C₃₇₀₀A₃₈₁₀T₃₈₂₀C₃₈₃₀A₃₈₄₀T₃₈₅₀C₃₈₆₀A₃₈₇₀T₃₈₈₀C₃₈₉₀A₃₈₀₀T₃₉₁₀C₃₉₂₀A₃₉₃₀T₃₉₄₀C₃₉₅₀A₃₉₆₀T₃₉₇₀C₃₉₈₀A₃₉₉₀T₃₀₀₀C₃₀₁₀A₃₀₂₀T₃₀₃₀C₃₀₄₀A₃₀₅₀T₃₀₆₀C₃₀₇₀A₃₀₈₀T₃₀₉₀C₃₀₀₀A₃₁₁₀T₃₁₂₀C₃₁₃₀A₃₁₄₀T₃₁₅₀C₃₁₆₀A₃₁₇₀T₃₁₈₀C₃₁₉₀A₃₁₀₀T<

第 2 表

(ダイズグリシニン A, A', B, c DNA の塩基配列)

GUAAGACGCGA¹ GATGCTGTC² GATGCTGAA³ AAT⁴ TCCCTGC⁵ C⁶ C⁷ C⁸ C⁹ C¹⁰ C¹¹ C¹² C¹³ C¹⁴ C¹⁵ C¹⁶ C¹⁷ C¹⁸ C¹⁹ C²⁰ C²¹ C²² C²³ C²⁴ C²⁵ C²⁶ C²⁷ C²⁸ C²⁹ C³⁰ C³¹ C³² C³³ C³⁴ C³⁵ C³⁶ C³⁷ C³⁸ C³⁹ C⁴⁰ C⁴¹ C⁴² C⁴³ C⁴⁴ C⁴⁵ C⁴⁶ C⁴⁷ C⁴⁸ C⁴⁹ C⁵⁰ C⁵¹ C⁵² C⁵³ C⁵⁴ C⁵⁵ C⁵⁶ C⁵⁷ C⁵⁸ C⁵⁹ C⁶⁰ C⁶¹ C⁶² C⁶³ C⁶⁴ C⁶⁵ C⁶⁶ C⁶⁷ C⁶⁸ C⁶⁹ C⁷⁰ C⁷¹ C⁷² C⁷³ C⁷⁴ C⁷⁵ C⁷⁶ C⁷⁷ C⁷⁸ C⁷⁹ C⁸⁰ C⁸¹ C⁸² C⁸³ C⁸⁴ C⁸⁵ C⁸⁶ C⁸⁷ C⁸⁸ C⁸⁹ C⁹⁰ C⁹¹ C⁹² C⁹³ C⁹⁴ C⁹⁵ C⁹⁶ C⁹⁷ C⁹⁸ C⁹⁹ C¹⁰⁰ C¹⁰¹ C¹⁰² C¹⁰³ C¹⁰⁴ C¹⁰⁵ C¹⁰⁶ C¹⁰⁷ C¹⁰⁸ C¹⁰⁹ C¹¹⁰ C¹¹¹ C¹¹² C¹¹³ C¹¹⁴ C¹¹⁵ C¹¹⁶ C¹¹⁷ C¹¹⁸ C¹¹⁹ C¹²⁰ C¹²¹ C¹²² C¹²³ C¹²⁴ C¹²⁵ C¹²⁶ C¹²⁷ C¹²⁸ C¹²⁹ C¹³⁰ C¹³¹ C¹³² C¹³³ C¹³⁴ C¹³⁵ C¹³⁶ C¹³⁷ C¹³⁸ C¹³⁹ C¹⁴⁰ C¹⁴¹ C¹⁴² C¹⁴³ C¹⁴⁴ C¹⁴⁵ C¹⁴⁶ C¹⁴⁷ C¹⁴⁸ C¹⁴⁹ C¹⁵⁰ C¹⁵¹ C¹⁵² C¹⁵³ C¹⁵⁴ C¹⁵⁵ C¹⁵⁶ C¹⁵⁷ C¹⁵⁸ C¹⁵⁹ C¹⁶⁰ C¹⁶¹ C¹⁶² C¹⁶³ C¹⁶⁴ C¹⁶⁵ C¹⁶⁶ C¹⁶⁷ C¹⁶⁸ C¹⁶⁹ C¹⁷⁰ C¹⁷¹ C¹⁷² C¹⁷³ C¹⁷⁴ C¹⁷⁵ C¹⁷⁶ C¹⁷⁷ C¹⁷⁸ C¹⁷⁹ C¹⁸⁰ C¹⁸¹ C¹⁸² C¹⁸³ C¹⁸⁴ C¹⁸⁵ C¹⁸⁶